

На правах рукописи

ПАВЛЮЧЕНКОВА СВЕТЛАНА МИХАЙЛОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ
КЛЕТОК И КЛЕТОК СЕРТОЛИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ**

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015 г.

Работа выполнена на кафедре эмбриологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Захидов Сабир Тишаевич
ФГБОУ высшего образования «Московский
государственный университет имени
М.В.Ломоносова», ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Сабурин Ирина Николаевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»,
заведующая лабораторией клеточной биологии
и патологии развития

доктор биологических наук
Домарацкая Елена Ивановна
ФГБУН Институт биологии развития имени
Н.К. Кольцова РАН, заведующая лабораторией
клеточных и молекулярных основ гистогенеза

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт молекулярной
генетики Российской академии наук

Защита состоится 17 марта 2015 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета
Д 501.001.52 при Московском государственном университете имени М.В.
Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12,
биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научной библиотеке
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте
<http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=671>

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.Н. Калистратова

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФГС – аномальные формы головок спермиев; ДТТ – дитиотреитол; КС – клетки Сертоли; ПАФ – параформальдегид; BrdU – бромдезоксинуридин (bromodeoxyuridine); EDTA (ЭДТА) – этилендиаминтетрауксусная кислота (ethylenediaminetetraacetic acid); MEM – среда Игла в модификации (modified Eagle's medium); НДС – натрия додецилсульфат.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Развитие мужских половых клеток или сперматогенез представляет собой сложный длительный процесс, строго упорядоченный во времени и пространстве. Сперматогенный процесс завершается образованием большого количества сперматозоидов, основная функция которых сводится к доставке отцовского генома в яйцеклетку, что в свою очередь обеспечивает наследственную преемственность в ряду поколений.

На протяжении многих лет фундаментальным исследованиям сперматогенеза уделяют особое внимание специалисты в области экспериментальной эмбриологии, клеточной и молекулярной биологии, генетики, репродуктивной биологии. Изучение сперматогенной системы в норме и после экспериментальных воздействий считается актуальным и потому, что направлено на решение важных проблем практического плана. Например, мужского бесплодия, последствий действия вредных факторов окружающей среды, оптимизации условий трансплантации половых клеток и вспомогательных нишеобразующих КС, усовершенствование методов искусственного оплодотворения, криоконсервации (Brinster, 2002; Gosden, Nagano, 2002; Handel, Sun, 2005; Jamsai, Bryan, 2011; Arregui, Dobrinski, 2014; Katib, Al-Hawsawi et al., 2014).

В связи с решением фундаментальных проблем и потребностями биомедицинских исследований в настоящее время особое место занимает разработка методов культивирования и трансплантации клеток сперматогенного эпителия (Ahmed et al., 2007; Ahmed et al., 2009; Chui et al., 2010; Sato et al., 2011; Guo et al., 2014; Medrano et al., 2014; Sadri-Ardekani, Atala, 2014). Клеточные и тканевые культуры *in vitro* и эктопическая трансплантация имеют большие перспективы для практической медицины, например в области генной и клеточной терапии, в преодолении некоторых форм мужского бесплодия, криоконсервации стволовых клеток онкологических больных репродуктивного возраста с целью защиты их генетического потенциала от эффектов химио- и радиотерапии (Arregui, Dobrinski,

2014). Эти разработки могут иметь значение также при создании трансгенных животных и сохранении исчезающих видов (Rodriguez-Sosa, Dobrinski, 2009).

Ускоренное развитие нанотехнологий, которое развернулось во многих странах мира, может грозить сильным загрязнением окружающей среде. Наноматериалы могут оказаться потенциально опасными для животного и растительного мира, здоровья человека. В этой связи следует добиваться тщательного изучения эффектов наночастиц на генетические и клеточные структуры (Лысцов, Мурзин, 2007; Захидов, 2010 а, б; Крысанов и др., 2011; Iavicoli et al., 2013; Thakur et al., 2014; Xu et al., 2014). Важным направлением в области экспериментальной нанотоксикологии, на наш взгляд, должны стать исследования последствий действия нанокорпускул и их комплексов с другими молекулами на наследственные структуры и клетки зародышевого пути, поскольку именно половые клетки связывают поколения между собой (Захидов, 2010 а, б; Hoet et al., 2004).

Цель исследования: комплексное изучение закономерностей развития мужских половых клеток и клеток Сертоли у мышей после различных экспериментальных воздействий.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить во времени количественные, морфогистологические и цитогенетические изменения клеток сперматогенного эпителия, а также изменения в организации ДНП-комплекса в зрелых сперматозоидах, после интратестикулярного введения химического мутагена дипина;
2. Описать поведение высокодифференцированных клеток Сертоли в культуре;
3. Исследовать особенности регенерации сперматогенной ткани после трансплантации под капсулу почки;
4. Изучить процесс развития мужских половых клеток после многократного воздействия наночастиц золота;
5. Оценить характер деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах после однократного и многократного воздействия наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки;
6. Изучить в условиях *in vitro* процесс деконденсации хроматина в зрелых сперматозоидах мышей после воздействия наночастиц золота.

Научная новизна работы

Впервые в сравнительном плане проведено комплексное изучение деструктивных и восстановительных процессов сперматогенеза у мышей после интратестикулярного введения химического мутагена и физиологического раствора.

Впервые установлено сосуществование в культуре КС двух популяций, различающихся по организации ядра и пролиферативной стратегии, что может быть проявлением гетерогенности, свойственной популяции КС половозрелых животных *in vivo*.

Впервые показано, что КС, находившиеся 12 дней в условиях *in vitro*, как и КС новорожденных мышей, проявили способность образовывать канальцеподобные структуры, содержащие КС. Впервые установлен факт длительного сохранения правильной организации семенных канальцев в трансплантатах после подсадки под капсулу почки канальцев от мутагенезированных животных.

Впервые изучены особенности развивающихся мужских половых клеток у мышей, подвергшихся многократному воздействию наночастиц золота. Впервые установлено, что наночастицы золота способны нарушать процесс тиолиндуцированной деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах в условиях *in vitro*.

Практическая и теоретическая значимость

Результаты исследования особенностей сперматогенеза после интратестикулярного введения дипина или физиологического раствора могут быть использованы для адекватной оценки последствий интратестикулярных инъекций, активно разрабатываемых для стерилизации самцов.

Методы интерфазной цитогенетики могут быть рекомендованы к использованию для характеристики культур клеток.

Эктопическая трансплантация сперматогенной ткани может быть использована как удобная модель для оценки морфогенетического потенциала КС и может применяться специалистами в области клеточных технологий.

Примененный в работе метод тиолиндуцированной деконденсации ядерного хроматина сперматозоидов млекопитающих *in vitro* может быть с успехом использован для оценки различных химических и физических агентов, в том числе наноматериалов на сперматотоксическую активность.

Разработан новый способ приготовления давленных препаратов семенных канальцев, значительно облегчающий и ускоряющий цитологический и цитогенетический анализы развивающихся сперматогенных клеток и КС.

Результаты настоящей работы могут быть использованы в курсе лекций по биологии развития, токсикологии и репродуктивной биологии.

Апробация диссертации

Результаты диссертационной работы были представлены на: VII Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», (Москва, 2010); 2-ой Международной школе «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и Наномедицина», (Московская область, 2011); XVIII, XIX и XXI Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2011, 2012, 2014); Всероссийской конференции с международным участием "Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция" к 135-летию со дня рождения П.П.Иванова (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, из них статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК – 3 (все переведены на английский язык), тезисов докладов и материалов конференций - 10, из них 4 устных доклада.

Личное участие автора

Работа выполнена непосредственно автором. Автором был проведен анализ научной литературы и всех полученных данных. Выводы сделаны на основании собственных оригинальных результатов. Соавторы указаны в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 151 странице, содержит 38 рисунков и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 293 цитируемых источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Постановка экспериментов. В работе были использованы самцы мышей-гибридов СВА×С57BL/6 в возрасте 2-3 мес. и мышей линии С57BL/6 двух возрастных групп: новорожденные (3-дн.) и половозрелые (2-3 мес.). Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. При работе с животными руководствовались приказом Минздрава РФ №267 от 19.06.2003г. Животных наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата концентрацией 400 мг/кг веса животного, вводили 200 мкл.

В опытах по интратестикулярному введению дипина подопытным животным однократно в интерстиций семенника вводили 15 мкл раствора дипина, в концентрации 0,45 мг/мл (разбавление в физиологическом растворе), а контрольным животным однократно в интерстиций инъецировали 15 мкл физиологического раствора.

В опытах по культивированию КС и трансплантации сперматогенного эпителия под почечную капсулу использовали мышей линии С57BL/6. При трансплантациях делали поверхностный разрез капсулы почки и помещали внутрь кусочки семенника или отдельные каналы. Для трансплантации клеток семенника, готовили суспензию ($C = 10^7 - 10^8$ кл./мл) и инъецировали в подпочечную капсулу. Клетки для трансплантации выделялись из семенников мышей-доноров той же линии двух возрастных групп: половозрелые самцы 2,5 - 3 месяцев и новорожденные 3-дневные самцы. В последней серии опыта половозрелым самцам под капсулу почки трансплантировали отдельные семенные каналы от взрослых

животных, которым за 14 сут до этого внутрибрюшинно был введен дипин в концентрации 30 мг/кг или культуру КС взрослых животных (12 суток *in vitro*).

Изучение влияния наночастиц золота на сперматогенез проводили на мышах-гибридах СВА×С57BL/6. Подопытным животным в течение четырех дней однократно внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл суспензии наночастиц золота (~2,5 нм) в концентрации 1×10^{15} частиц на мл (ч/мл), контрольной группе животных вводили 0,2 мл физиологического раствора.

Получение суспензии клеток семенника. Семенники помещали в раствор Хэнкса (без кальция и магния), удаляли с них белочную оболочку и переносили на 5 мин в раствор с антибиотиками - пенициллин/стрептомицин (Пан-Эко, 1:50). Затем пинцетами разделяли семенники на отдельные каналцы, переносили их в раствор Хэнкса, содержащий коллагеназу IV типа (1 мг/1.5 мл) и 0,04% ДНКазу I (все Sigma) и инкубировали при +37°C 15 мин. После инкубации каналцы промывали 2–3 раза Хэнксом. Затем добавляли к каналцам раствор трипсина (0.25%) с 1 mM ЭДТА (Sigma) и инкубировали при +37°C 15 мин. После этого в раствор добавляли 5% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma), затем промывали каналцы 2 раза Хэнксом. После отмывали средой (состав среды: F12:MEM, 1:1; pH 7.0–7.2). Затем клетки фильтровали через «грубый» фильтр (~200–300 мкм), а затем через фильтр с размером пор 40 мкм. Подсчитывали число клеток в камере Горяева и разводили осадок, чтобы концентрация клеток в суспензии составила 10^7 – 10^8 кл./мл. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 400 g (2000 об./мин) и помещали осадок в среду для трансплантации клеток (12 (среда MEM/F12) : 5 (10% FBS) : 2 (ДНКазы I, 2 мг/мл) : 1 (0.4%-ный раствор трипанового синего).

Культивирование клеток Сертоли. После выделения клеток семенника в суспензию. После подсчета числа клеток в камере Горяева (см. выше), в нее добавляли антибиотики и сыворотку.

$$V \text{ суспензии (мл)} = \frac{(\text{число клеток}) \times 0.21 \text{ мл/см}^2}{180000 \text{ клеток/см}^2}.$$

Состав среды = 5% FBS + 2% Пенициллин/Стрептомицин + 0.05% Амфотерицин + 93% MEM:F12).

Полученную суспензию клеток распределяли по чашкам Петри, на дне которых лежали культуральные стекла диаметром 10, 12 и 24 мм. Инкубировали при +37°C (5% CO₂) и через 3 ч производили смену половины среды. Через 24 ч промывали раствором Хэнкса прикрепившиеся КС, затем переносили клетки в среду, содержащую 1% сыворотки (FBS).

Фиксация материала, приготовление и окрашивание препаратов.

Для гистологического анализа семенники и почки фиксировали в растворе Буэна или mDf (модифицированный фиксатор Дэвидсона) в течение 4 сут. Готовили парафиновые срезы толщиной 7 мкм (микротом «Рейхарт-2030», Германия),

которые окрашивали гематоксилином-эозином по методу Караччи, заключали в канадский бальзам или биомаунт. Срезы просматривали на «Leica DM RXA2».

Для количественного анализа сперматогенных клеток различных типов и КС целый семенник помещали в смесь воды, ледяной уксусной кислоты, глицерина и 5%-ной сахарозы (7,5:1:1:0,5) на 2-3 нед. Затем его механически разрушали; полученную суспензию клеток анализировали в камере Горяева с помощью фазово-контрастного устройства при увеличении 400× («Opton», Германия).

Для цитогенетического анализа сперматогенных клеток, а также для цитоспектрофотометрического изучения содержания ДНК-фуксина и анализа структуры хроматина КС готовили отпечатки и/или давленные препараты. Один из извлеченных семенников разрезали пополам, промокали фильтровальной бумагой поверхность среза и делали отпечатки на предметном стекле. Препараты высушивали на воздухе и фиксировали в 10% забуференном растворе формалина (pH 7.2) 10-15 мин. Затем отмывали в проточной воде и высушивали на воздухе. Другую часть семенника помещали в 7% раствор PVP (поливинилпирролидона) на льду, разделяли каналы и переносили их на предметное стекло в каплю PVP, покрывали полиэтиленовой пленкой, накрывали еще одним предметным стеклом и раздавливали, затем охлаждали в парах жидкого азота, удаляли полиэтиленовые пленки, фиксировали в 96% спирте. Отпечатки и давленные препараты окрашивали по Фельгену: кислотный гидролиз в 5N HCl при 37°C в течение 11 мин с последующим окрашиванием в реактиве Шиффа в течение одного часа при комнатной температуре.

Для выявления морфологии ядрышек готовили отпечатки и давленные препараты семенника, фиксировали в течение 10 мин в 96%-ном спирте. После этого препараты обрабатывались 0.1%-ным раствором тритона X-100 (5 мин) и промывали в двух сменах 50%-ного этилового спирта (по 10 мин). После высушивания на препарат наносили смесь, состоящую из 2 объемных частей 50%-ного нитрата серебра и 1 части 2%-ной желатины. Предметное стекло покрывали полиэтиленовой пленкой, помещали во влажную камеру в термостат (60°C, 10 мин). Реакцию останавливали промывкой препарата в холодной воде, затем стекло на 30 сек помещали в 5%-ный раствор гипосульфита натрия, после промывали в проточной воде. Препараты докрашивали метиловым зеленым.

Для иммуноцитохимического выявления КС использовали антитела mouse monoclonal IgM anti-vimentin (Sigma). Культуру КС выращивали на стеклышках, (см. выше). Клетки фиксировали в 4%-ном ПАФ (15 мин), промывали в PBS (Phosphate buffered saline, 10 mM, pH 7.4). Затем инкубировали в 3%-ном растворе H₂O₂ (Sigma) 20 мин при комнатной температуре. Затем отмывали и помещали в 0,05% раствор тритона X-100 (Helicon) на 15 мин. После отмывки в PBS, клетки 30 мин инкубировали в блокирующем растворе (3% goat serum (Invitrogen), 7% BSA (Bovine

Serum Albumin, Sigma)) во влажной камере. Затем на стеклышки наносили первые антитела (1,5 ч, комнатная температура, влажная камера). Отмыв первые антитела, еще час инкубировали со вторыми антителами goat anti-mouse IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma). Затем отмывали, помещали в раствор стрептавидин-пероксидазы хрена (VectorLab) на 30 мин, вновь отмывали и для выявления пероксидазы хрена 6-10 мин держали в растворе хромогена 3,3'-диаминобензидина - DAB (VectorLab), после промывали 3 мин в холодной воде, высушивали и заключали в канадский бальзам.

В случае двойной окраски на vimentin/BrdU за 15–19 ч до окрашивания в среду к клеткам добавляли BrdU, 25 мг/мл (Sigma). После промывки стеклышек в холодной воде (после окрашивания на vimentin) их промывали в PBS, повторно фиксировали в 4%-ном ПАФ, промывали, денатурировали ДНК в растворе: 4N HCl : 70%-ный спирт (1:1) 30 мин, промывали и затем инкубировали 1,5 ч с биотинилированными антителами mouse monoclonal IgG anti-BrdU (Sigma). После отмывки антител следовали описанной выше схеме.

Для иммунофлуоресцентного выявления КС использовали первые антитела rabbit polyclonal IgG anti-Wilms tumor 1 (Invitrogen), а в качестве вторых антител - флуоресцентные антитела donkey anti-rabbit (AlexaFluor 488). Клетки фиксировали в 4%-ном ПАФ (15 мин), затем отмывали в TBS (Tris buffered saline, 50 mM, pH 7.4) и помещали в 0,05% раствор тритона X-100 (Helicon) на 15 мин. После отмывки 30 мин инкубировали в блокировочном растворе (5% BSA). Затем на стеклышки наносили первые антитела (1,5 ч, комнатная температура). Отмыв первые антитела, еще час инкубировали со вторыми антителами в темноте. Затем отмывали и помещали в раствор 4,6-диамидино-2-фенилиндола - DAPI (VectorLab) на 30 мин (в темноте). Затем стеклышки отмывали в TBS и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DM RXA2» при длине волны 360 нм.

Цитогенетические методы. Для оценки частоты встречаемости сперматогенных клеток со следами хромосомных аномалий был использован *метод учета сперматогонияльных и мейотических микроядер*. На окрашенных по Фельгену препаратах просматривали 300-500 сперматогониев и не менее 1000 округлых сперматид от каждого животного. Число генетически аномальных клеток выражали в промилле. Для оценки частоты возникновения точечных генных мутаций и микроделеций был использован *метод учета аномалий форм головок спермиев (АФГС)*. Для определения частоты встречаемости абберантных форм в популяции тестикулярных спермиев просматривали не менее 300 гамет от каждого животного. Число аномальных сперматозоидов выражали в процентах.

Цитоспектрофотометрический анализ. Количественное определение содержания ДНК-фуксина в ядрах КС проводили с помощью метода прямой сканирующей денситометрии (микроденситометр Виккерс-М86).

Метод деконденсации хроматина спермиев *in vitro*.

Исследовали эпидидимальные сперматозоиды мышей: 1) после интратестикулярного введения дипина, 2) после одно- и многократного воздействия наночастиц золота, 3) после инкубации зрелых сперматозоидов в золе наночастиц Au (размером ~ 2.5 нм и в концентрациях 1×10^{15} и/или 0.5×10^{15} частиц на 1 мл).

Животных забивали путем дислокации шейных позвонков, извлекали эпидидимисы, каудальные отделы которых помещали в физиологический раствор и готовили суспензию. После центрифугирования (1000g, 15 мин) надосадочную жидкость сливали, а осадки спермиев разбавляли в 1 мл 1%-ного раствора натрия додецилсульфата (НДС, Sigma, USA); полученную суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Через 30 мин в контрольные и опытные образцы добавляли по 0.3 мл 0.01М раствора дитиотреитола (ДТТ, Sigma, USA), приготовленного на трис-HCl буфере (pH=8.0), и продолжали инкубацию при комнатной температуре в течение 40 мин в случае интратестикулярного введения дипина и в течение 20 и 40 мин в опыте с одно- и многократным введением наночастиц золота.

По завершении инкубации спермиев в растворе ДТТ готовили мазки, которые после высушивания фиксировали в 96%-ном этиловом спирте в течение 10 мин и затем окрашивали 0.1%-ным раствором толуидинового синего (Fluka, Switzerland). Мазки окрашенных спермиев с различной степенью деконденсации ядер анализировали с помощью микроскопа "Opton" (West Germany) при общем увеличении 1000 $\times$, просматривая 100 случайно выбранных полей зрения.

В опытах по инкубации эпидидимальных сперматозоидов с наночастицами золота в условиях *in vitro* следовали выше описанной схеме с некоторыми модификациями, а именно: после инкубации зрелых гамет в растворе НДС суспензии разделяли на несколько частей. В одну из них добавляли физиологический раствор (контроль), в остальные – комплекс, состоящий из наночастиц золота (размером ~ 2.5 нм) и среды, в концентрациях, соответственно, 1×10^{15} и 0.5×10^{15} частиц на 1 мл (ч/мл). Через 20 и 40 мин в контрольные и опытные образцы добавляли по 0.3 мл 0.01М раствора ДТТ, приготовленного на трис-HCl буфере (pH=8.0), и продолжали инкубацию в течение 20 и 40 мин при комнатной температуре. По завершении обработки спермиев в растворе тиолового реагента готовили препараты по выше описанной схеме.

Статистическая обработка данных. При оценке достоверности различий средних в случае больших выборок (количественный анализ) использовали параметрический критерий Стьюдента, а для оценки достоверности различий между небольшими выборками (цитогенетический анализ, тест на АФГС) использовали непараметрический критерий Вилкоксона при стандартном уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. Изучение динамики развития мужских половых клеток у мышей после интратестикулярного введения модельного мутагена дипина.

I.1. Количественный анализ сперматогенеза.

У контрольных мышей (физиологический раствор) число пахитенных сперматоцитов к 14 сут незначительно уменьшалось по сравнению с 7 сут, и восстанавливалось на 56 и 100 сут после начала эксперимента (рис 1 А). У подопытных животных (дипин) число пахитенных сперматоцитов на 14 сут фиксации практически достигало нулевого значения, однако на 56 и 100 сут число этих клеток вновь достигало уровня контроля.

Число округлых сперматид и сперматозоидов у контрольных мышей на 7 сут эксперимента было достоверно больше, чем в семенниках у интактных животных (не подвергавшимся никаким воздействиям), к 35 сут происходило постепенное снижение их числа, а с 56 сут их число вновь возрастало и к 100 сут фиксации достигало уровня интактного контроля (рис. 1 Б, В). Аналогичная тенденция количественных изменений спермиогенных клеток наблюдалась и у подопытных самцов: при этом число как округлых сперматид, так и сперматозоидов было достоверно ниже по сравнению с контролем на 14 и 35 сут, а на 56 и 100 сут после начала эксперимента число этих клеток было сравнимо с контрольным уровнем.

У контрольных мышей число КС на протяжении эксперимента достоверно не менялось (рис. 1 Г). У подопытных мышей на 14 сут фиксации число КС достоверно возрастало, а на 35 сут, наоборот, снижалось. На 56 и 100 сут число КС вновь восстанавливалось до исходного уровня.

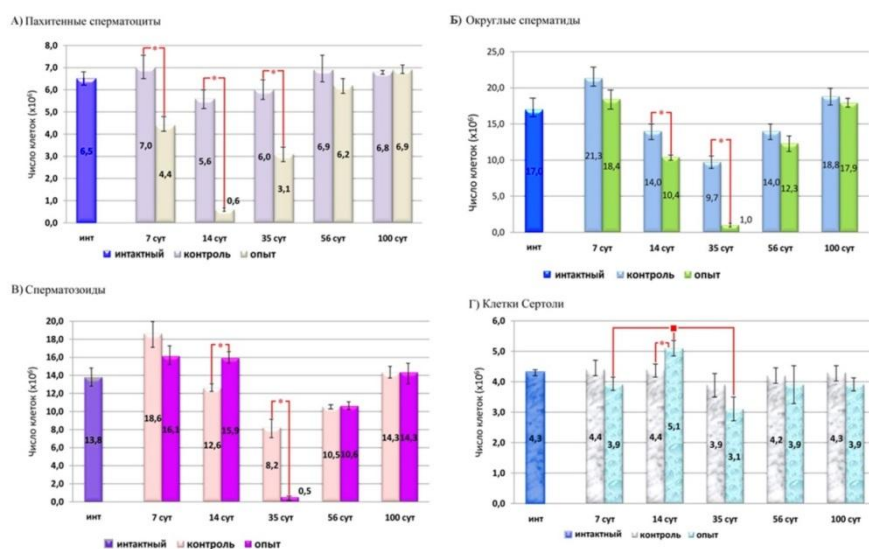


Рис.1. Результаты количественного анализа динамики изменения числа половых клеток и клеток Сертоли у контрольных и подопытных животных.

Примечание: * и ■ различия средних статистически достоверны при $p \leq 0,05$.

1.2. Гистологический анализ сперматогенного эпителия.

У контрольных животных на 7 сут фиксации семенные каналыцы были неоднородны. В большинстве случаев на срезах встречались каналыцы с нормальной структурой сперматогенного эпителия (рис. 2 а). В других каналыцах структура сперматогенного эпителия была существенно повреждена. Наблюдалась дезорганизация сперматогенного эпителия и появление клеток с апоптозоподобной структурой ядер (рис. 2 а, б). При этом же сроке фиксации у подопытных самцов патологическая картина сперматогенеза была более выражена, хаотична и разнообразна. Встречались каналыцы с блоком развития половых клеток на стадии пахитенных сперматоцитов (рис. 2 в, г). Наблюдалось нарушение на клеточном уровне, например, ядерные вакуоли в пахитенных сперматоцитах (рис. 2 в), слущивание клеток в просвет каналыцы (рис. 2 в).

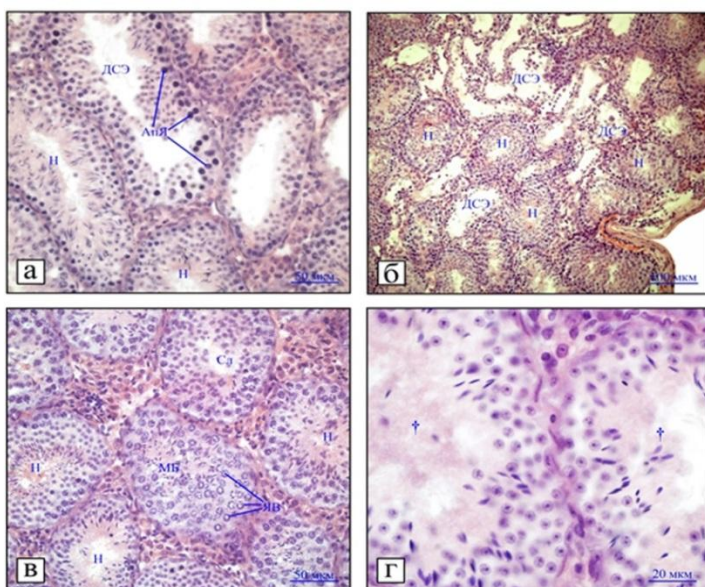


Рис. 2. Срезы семенников контрольных (а, б) и подопытных (в, г) мышей на 7 сут эксперимента.

Обозначения: АпЯ – апоптозоподобные ядра,

ДСЭ – дезорганизация сперматогенного эпителия,

МБ – мейотический блок,

Н – каналец с нормальным

сперматогенезом, Сл – слущивания,

ЯВ – ядерная вакуоль, † – каналыцы без мейотических клеток.

Окраска: гематоксилин-эозин.

На 14 сут фиксации у двух из пяти контрольных животных наблюдалась полная дегенерация сперматогенного эпителия (рис. 3 а). У остальных большинство каналыцев сохраняли правильную округлую форму, в них не было замечено никаких значительных нарушений в развитии половых клеток (рис. 3 б). В подопытной группе у двух из шести животных семенники полностью дегенерировали: каналыцы расходились, в них присутствовали только КС. В других семенниках нарушения сперматогенеза также были значительными: практически полностью отсутствовали мейотические клетки (рис. 3 г). Среди нарушений наиболее частыми были дезорганизация сперматогенного эпителия, слущивание половых клеток (рис. 3 в).

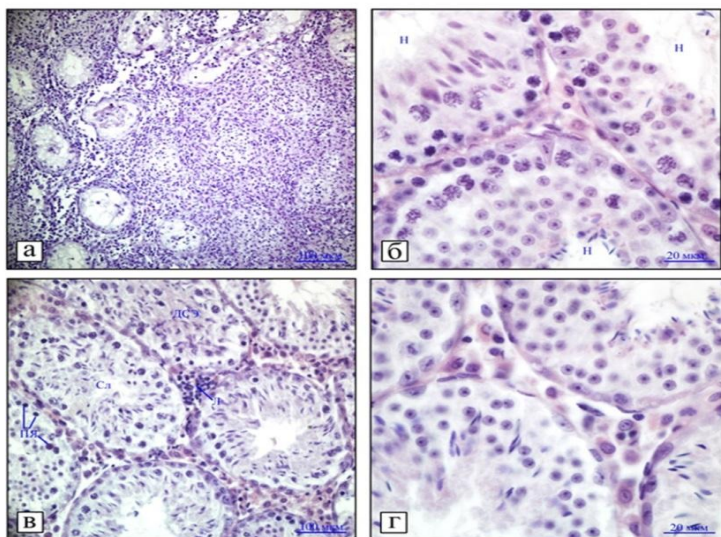


Рис. 3. Срезы семенников контрольных (а,б) и подопытных (в,г) мышей на 14 сут эксперимента. **Обозначения:** ДСЭ – дезорганизация сперматогенного эпителия, Л – лейкоциты в интерстициальной ткани, Н – каналец с нормальным сперматогенезом, ПЯ – пикнотические ядра, Сл – слущивание половых клеток. **Окраска:** гематоксилин-эозин.

У контрольных самцов на 35 сут фиксации общая картина сперматогенеза в целом оставалась нормальной, в то время как у подопытных животных нормальное течение сперматогенного процесса было нарушено во всех без исключения каналцах. Наблюдалось отсутствие в большинстве каналцев различных типов сперматогенных клеток: можно выделить каналцы, в которых полностью отсутствовали сперматиды или спермии. В каналцах часто встречались межклеточные пространства, клетки с ядерными вакуолями, отслоения.

На 56 сут фиксации в контроле морфология сперматогенеза в большей части каналцев была нормальной. У подопытных животных структура сперматогенного эпителия восстанавливалась по сравнению с предыдущим сроком фиксации. Тем не менее, отслоения и слущивание сперматогенных клеток в просвет каналца, межклеточные пространства и дезорганизация структуры сперматогенного эпителия продолжали обнаруживаться. На 100 сут эксперимента как у контрольных, так и подопытных мышей на срезах семенников в основном встречались каналцы с нормальной структурой сперматогенного эпителия.

1.3. Цитогенетический анализ сперматогенеза.

У контрольных и подопытных мышей на 35, 56 и 100 сут последействия частота встречаемости сперматогониев с микроядрами была практически одинакова. То же справедливо и для популяции округлых сперматид. Интересно отметить, что как в контроле, так и в опыте на 100 сут фиксации число генетически аномальных сперматогониев и округлых сперматид существенно уменьшалось по сравнению с предыдущими сроками фиксации (35 и 56 сут).

В свою очередь, тест на аномалии форм головок спермиев показал, что на 35 сут фиксации в гонадах подопытных мышей частота встречаемости aberrантных форм возрастала более чем в 30 раз (58,5% против 1,72% в контроле). Однако на 56 и 100 сут последействия число морфологически аномальных сперматозоидов в опыте вновь снижалось до нормального контрольного уровня.

1.4. Анализ способности к деконденсации in vitro ядерного хроматина эпидидимальных сперматозоидов.

Светооптические наблюдения выявили различную чувствительность эпидидимальных демембранизированных НДС спермиев мышей к эффекту ДТТ. По степени распаковки ядерного хроматина гаметы были условно разделены на три группы: недеконденсированные, частично и полностью деконденсированные; встречались также аномальные ядра с вакуолями (рис. 4 а-в).

Как видно из рис. 5, на 7, 14, 56 и 100 сут после начала эксперимента у контрольных (физиологический раствор) и подопытных (дипин) мышей процентное соотношение внутри каждой группы ядер - недеконденсированных, частично и полностью деконденсированных - было примерно одинаковым. На 35 сут в опытном материале эпидидимальных сперматозоидов не было обнаружено. Важно отметить, что в ходе эксперимента как в контроле, так и в опыте число недеконденсированных ядер существенно увеличивалось, а число ядер с полностью деконденсированным хроматином, наоборот, сильно уменьшалось по сравнению с интактным контролем.

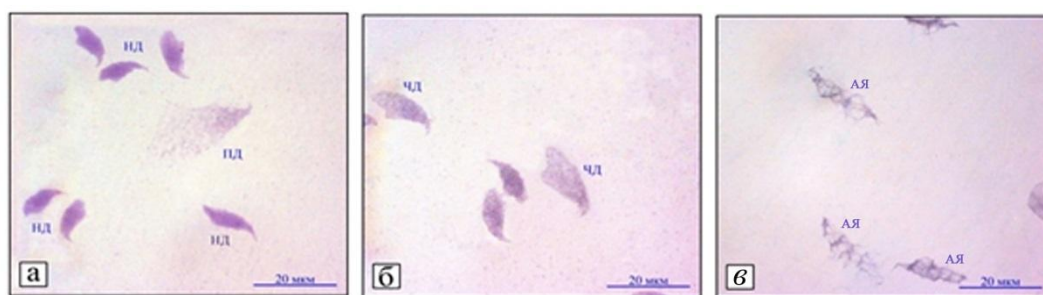


Рис.4. Ядра эпидидимальных сперматозоидов мышей после комбинированной обработки НДС/ДТТ. **Обозначения:** АЯ – аномальные ядра, НД – недеконденсированные ядра, ЧД – частично деконденсированные ядра, ПД – полностью деконденсированные ядра. **Окраска:** толуидиновый синий.

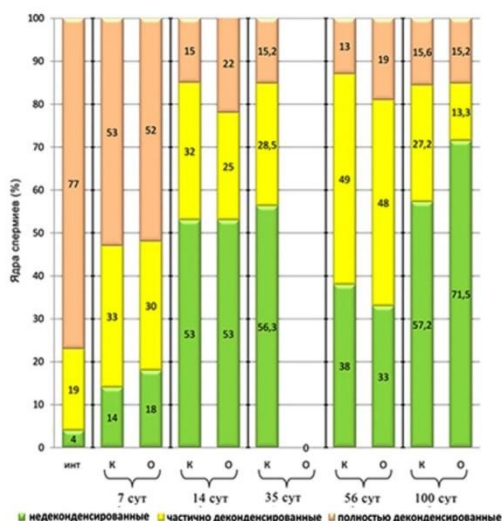


Рис.5. Соотношение числа сперматозоидов с разной степенью деконденсации хроматина в контроле и опыте после 40 мин инкубации в ДТТ. **Обозначения:** инт – интактный контроль, К – контроль (физиологический раствор), О – опыт (дипин).

II. Культивирование клеток Сертоли.

Число vimentin+-клеток и Wt1+-КС (рис. 6) в культуре возрастало с 3 по 20 сут культивирования (Vimentin – белок цитоскелета, экспрессируемый КС, а также перитубулярно-мышечными клетками; Wilms tumor factor выявляется только в КС (рис. 7). Что касается vimentin+/BrdU+-клеток, то динамика их изменения носила волнообразный характер, на 12 сут пришелся максимум пролиферации клеток в культуре, так как на 20-е сут число BrdU+-клеток снизилось до 21%.

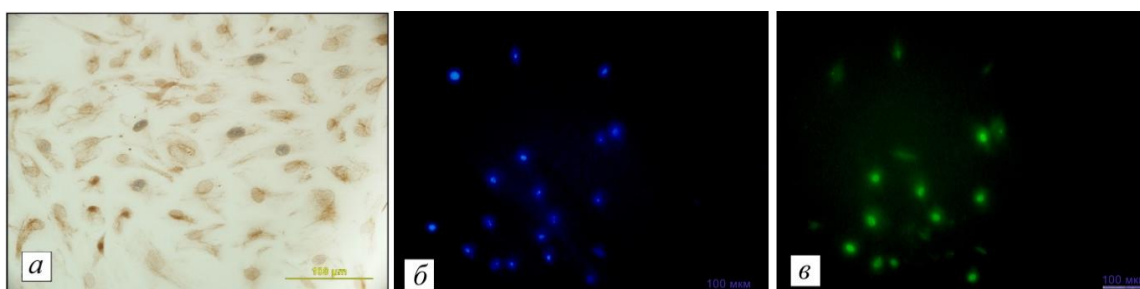


Рис.6. Культура КС на 6 сут (б, в) и 12 сут (а).

а - vimentin+/BrdU+ –клетки (коричневая цитоплазма / серые ядра).
б, в - последовательное иммуноцитохимическое окрашивание DAPI и антителами к Wt1 (Wilms tumor 1) на 6 сут культивирования.

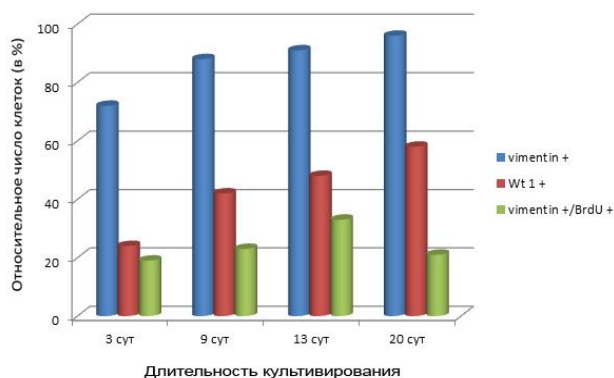


Рис.7. Динамика изменения числа клеток, экспрессирующих маркеры КС (vimentin, Wt1), а также включающих BrdU, в % от общего числа клеток в культуре, ($3,5 \cdot 10^5$ кл/см²).

Анализ КС, окрашенных для выявления ядрышковых белков, показал, что на 3 сут культивирования популяция КС (определяемая по экспрессии специфических маркеров) представлена двумя типами клеток. Существуют КС с типичной для них *in vivo* организацией ядра, а также встречаются двужадерные КС, клетки с микроядрами и протрузиями, гигантскими (полиплоидными) ядрами (рис. 8 а-в), что, в свою очередь, не характерно для КС половозрелых самцов *in vivo*. Цитофотометрические измерения содержания ДНК-фуксина в клетках

Сертоли выявили наличие ди-, тетра и октаплоидных ядер, значительно различающихся по размеру.

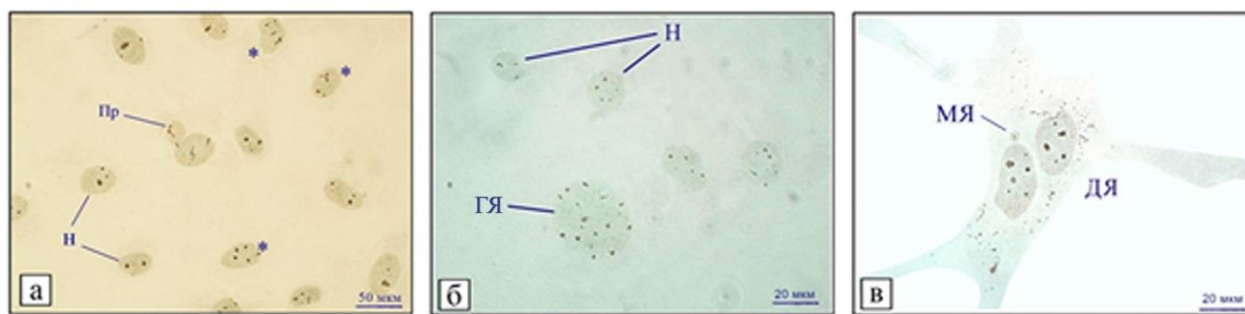


Рис.8. Клетки Сертоли на 3 сут (б, в) и 6 сут (а) культивирования.

Обозначения: ДЯ - двуядерная КС, МЯ – микроядро, Н - КС с нормальной организацией ядра, Пр – протрузия, ГЯ – гигантское (полиплоидное) ядро КС, * - КС с измененной организацией ядра. **Окраска:** серебрение, метиловый зеленый.

III. Трансплантации сперматогенной ткани под капсулу почки.

Через 4 нед после трансплантации под почечную капсулу кусочков семенников или отдельных семенных канальцев 3–дневных мышат, в трансплантатах (рис. 9 А) наблюдали развитие сперматогенного процесса. Так, на гистологических срезах встречались канальцы, содержащие КС и сперматогонии (рис. 9 Б), а также канальцы, в которых присутствовали сперматоциты I порядка (рис. 9 В). Через 4 нед после трансплантации под почечную капсулу суспензии клеток, полученной из семенников 3–дневных мышат, у всех изученных животных обнаруживались новообразованные семенные канальцы, содержащие в основном КС (рис. 9 Г, Д).

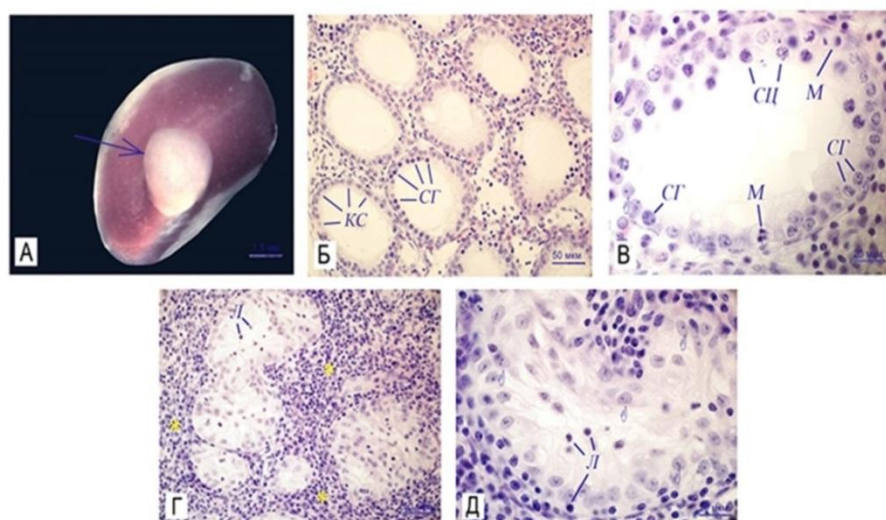


Рис. 9. А - общий вид трансплантата. Б, В - срезы трансплантатов семенных канальцев 3-х дневных мышей. Г, Д - срезы трансплантатов, образовавшихся через после введения суспензии клеток семенников от 3-х дневных мышей (4 недели после трансплантации).

Обозначения: КС, - клетка Сертоли, Л - лейкоциты в просвете канальцев, М – митоз, СГ – сперматогонии, СЦ – сперматоциты, * - скопление клеток иммунной системы. Стрелкой показан трансплантат. **Окраска:** гематоксилин – эозин.

Через 4 нед после трансплантации под почечную капсулу кусочков семенников или отдельных канальцев взрослых мышей (2,5 мес) во всех трансплантатах присутствовали семенные канальцы, лишенные половых клеток, наблюдались только КС, часть которых оставалась прикрепленной к базальной мембране, остальные находились в просвете канальцев. Через 10 недель все КС перемещались в просвет канальцев.

Через 4 нед после трансплантации под капсулу почки суспензии клеток, полученной от половозрелых самцов (2,5 мес), формирования сперматогенного эпителия не наблюдалось.

Через 4 нед после трансплантации отдельных канальцев или кусочков семенников половозрелых животных, которым за 14 сут до этого был внутрибрюшинно введен дипин, на гистологических срезах обнаруживались семенные канальцы, содержащие КС (рис. 10 а). При этом через 10 нед сохранность канальцев и КС в них оставалась прежней.

Через 4 нед после трансплантации КС, культивированных *in vitro* в течение 12 дней, происходило образование канальцеподобных структур, содержащих клетки, которые по морфологии соответствовали КС (рис. 10 б, в).

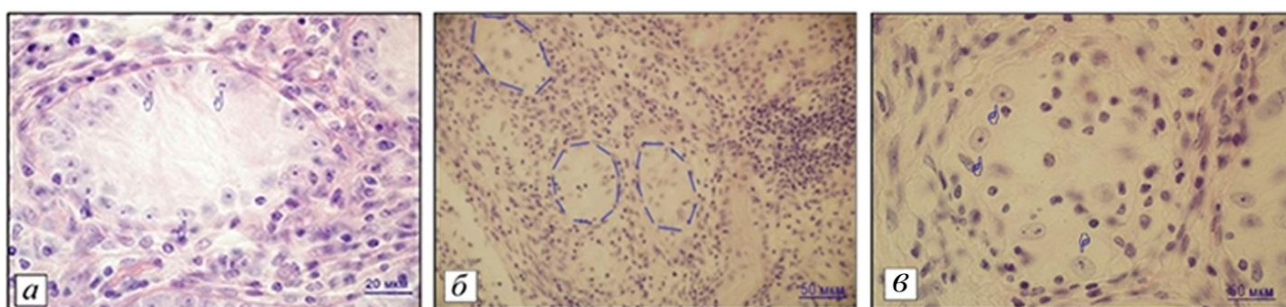


Рис.10. а - срезы трансплантатов семенных канальцев, взятых от взрослых мышей через 14 дней после введения дипина, через 4 нед после помещения под почечную капсулу. б, в - срезы трансплантата культуры КС (12 дней *in vitro*) через 4 нед после введения под капсулу почки.

Обозначения: ☞ - КС. Обведены канальцеподобные структуры.

Окраска: гематоксилин – эозин.

IV. Изучение последствий многократного действия наночастиц золота на развивающиеся мужские половые клетки у мышей.

IV.1. Гистологический анализ сперматогенеза.

Изучение срезов семенников мышей, подвергшихся многократному воздействию наночастиц золота, не обнаружило в большинстве семенных канальцев каких-либо существенных морфологических отклонений от нормы как на 14-е, так и на 56-е сут фиксации.

IV.2. Цитогенетический анализ сперматогенеза.

Число сперматогониев с микроядрами у подопытных животных на 14 сут фиксации увеличивается по сравнению с контролем, однако это увеличение не является статистически достоверным при уровне значимости $p \leq 0,05$. На 56-е сут фиксации генетически аномальные сперматогонии встречались в гонадах контрольных и подопытных животных практически с одинаковой частотой. Что касается частоты встречаемости округлых сперматид со следами хромосомных поломок, то в опыте на 14 сут эта частота увеличивалась по сравнению с контролем в 3 раза (различия статистически достоверны при $p \leq 0,05$), но к 56 сут вновь снижалась до контрольного уровня.

V. Изучение процесса деконденсации хроматина в зрелых сперматозоидах мышей после однократного и многократного воздействия наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки.

Динамика деконденсации ядерного материала в эпидидимальных сперматозоидах мышей на 14 сут после однократного внутрибрюшинного введения наночастиц золота представлена на рис. 11 (а, б). Видно, что в опыте уже через 20 минут после обработки ДТТ недеконденсированные ядра фактически полностью отсутствовали, в то время как в контрольных образцах были обнаружены все три основных типа ядер. Через 40 минут после тиоловой обработки число "озолоченных" спермиев с полностью деконденсированными ядрами составило 100%, тогда как в контроле таких ядер было 44,5%.

Принципиально другая количественная картина декомпактизации хроматина наблюдалась в популяции эпидидимальных спермиев после многократного введения наночастиц Au животным. Видно (рис. 11 в, г), что после 20-минутной инкубации клеточной суспензии в растворе ДТТ число гамет с полностью деконденсированными ядрами составило, соответственно, 26% в опыте и 7% в контроле. Однако после 40-минутной инкубации частоты встречаемости ядер с полностью деконденсированным хроматином в опыте и контроле оказались весьма близкими – 32% и 40%, соответственно.

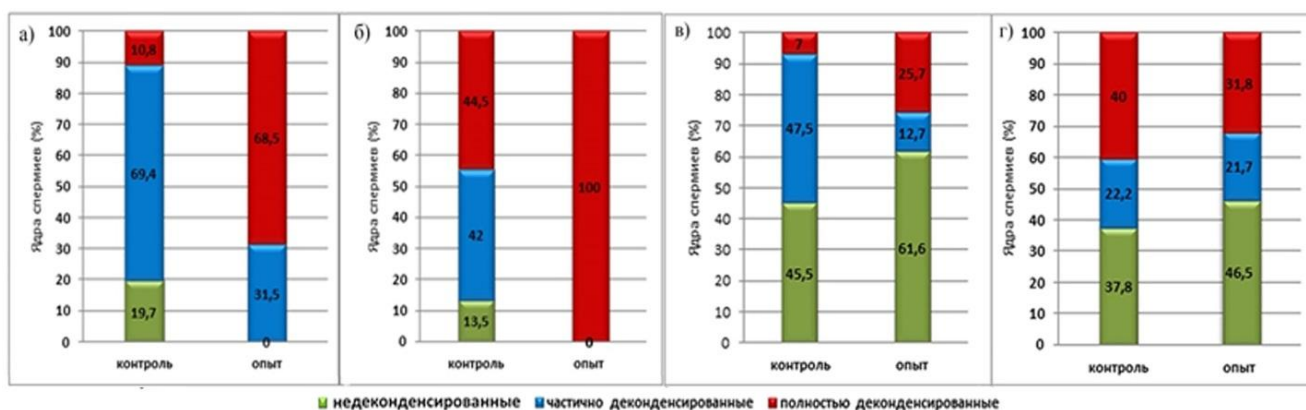


Рис.11. Частота встречаемости недеконденсированных, частично и полностью деконденсированных ядер в эпидидимальных спермиях мышей на 14 сут после однократного (а, б) и многократного (в, г) внутрибрюшного введения наночастиц золота ($C=1 \times 10^{15}$ частиц/мл).
а, в – через 20 мин инкубации в ДТТ, б, г – через 40 мин инкубации в ДТТ.

VI. Эффект наночастиц золота на процесс деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах в условиях *in vitro*.

Результаты подсчетов частоты встречаемости половых клеток с разной степенью деконденсации ядерного материала суммированы на рис. 12. Видно, что в отличие от контроля процесс деконденсации ядерного хроматина в «озолоченных» сперматозоидах при всех выбранных условиях эксперимента сильно нарушен.

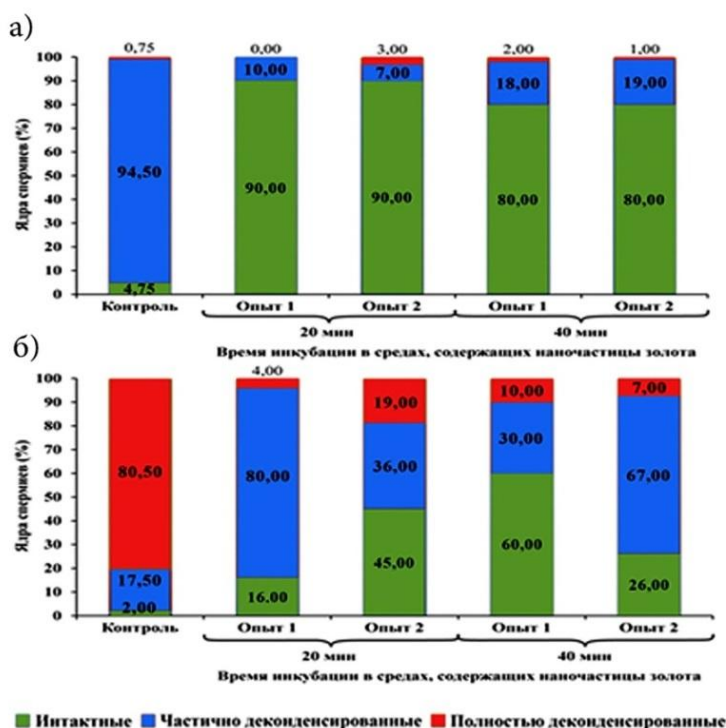


Рис. 12. Соотношение числа сперматозоидов с разной степенью деконденсации хроматина в контроле и опыте после 20 мин (а) и 40 мин (б) инкубации в ДТТ.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе данные показали, что однократная интратестикулярная инъекция мышам химического мутагена дипина (опыт) или физиологического раствора (контроль) вызывает существенные деструктивные изменения в организации сперматогенного эпителия, носящие обратимый характер. Правда, в мутагенизированных семенниках животных их проявление было более выражено. Если судить по результатам оценки частоты встречаемости сперматогониальных и мейотических микроядер на отдаленных сроках последствия, становится очевидным, что по цитогенетическим эффектам на ССК дипин и физиологический раствор не уступали друг другу. С другой стороны, тот факт, что как в контроле, так и в опыте, в популяции округлых сперматид частота встречаемости клеток с хромосомными поломками была весьма высокой и примерно одинаковой, скорее всего можно объяснить нарушениями ферментных систем репарации, в норме действующих в профазе мейоза. Эти нарушения, как можно предполагать, могут вызывать усиление спонтанного мутагенеза. Особого внимания заслуживает тот факт, что главный повреждающий эффект интратестикулярных инъекций дипина или физиологического раствора на сперматогенез мышей проявился в наибольшей степени при тиолиндуцированной деконденсации ядерного хроматина зрелых эпидидимальных спермиев *in vitro*. Эти наши наблюдения подтверждают известную точку зрения о том (Qui et al., 1995), что количественная оценка химически индуцированных изменений в характере разбухания и декомпактизации ядер зрелых спермиев, может стать весьма полезным инструментом в понимании последствий влияния репродуктивных токсикантов на сперматогенную функцию.

С помощью методов интерфазной цитогенетики были проанализированы культуры КС половозрелых мышей. Впервые нами показано, что в условиях *in vitro* популяция КС разделяется на два «типа», различающихся по морфологии и пролиферативной стратегии, что вполне может быть отражением существующей гетерогенности популяции этих клеток.

Выполненные в работе трансплантационные эксперименты воспроизвели результаты, полученные другими исследователями: развитие сперматогенеза после трансплантации фрагментов сперматогенной ткани или суспензии клеток семенника от новорожденных животных (Schlatt et al., 2003) и остановку развития после трансплантации сперматогенного эпителия от взрослых самцов (Kim et al., 2007). Поведение же сперматогенного эпителия в эктопических условиях после введения химического мутагена дипина мышам-донорам описано впервые. В этом случае наблюдалось сохранение целостности семенных канальцев и КС в них.

Обнаружена возможность образования канальцеподобных структур при помещении под капсулу почки КС, культивируемых в условиях, стимулирующих их к пролиферации. Таким образом, полученные результаты подтверждают справедливость гипотезы о стимуляции КС к делению как обязательном условии реализации их регенеративного потенциала.

Показано, что многократное введение животным наночастиц Au размером ~2.5 нм в целом не нарушало структурную организацию сперматогенного эпителия и не оказывало выраженного мутагенного эффекта на сперматогониальные стволовые клетки. Однако наночастицы золота индуцировали слабые обратимые хромосомные мутации в ранних сперматоцитах I порядка, о чем свидетельствуют результаты подсчета частоты встречаемости округлых сперматид с микроядрами на 14 сут последствий.

С помощью метода деконденсации гаметического хроматина *in vitro*, установлено, что в опыте с многократным воздействием наночастиц золота на постмейотические клетки мышей большое число ядер эпидидимальных спермиев (14 сут фиксации) проявило устойчивость к действию деконденсирующего агента ДТТ. Эта устойчивость фактически не уступала устойчивости нормальных зрелых гамет, не испытывавших на себе в спермиогенезе действия наночастиц Au. Напротив, в опыте с однократным воздействием наночастиц золота на спермиогенные клетки процесс индуцированной декомпактизации хроматина в эпидидимальных спермиях шел в ускоренном темпе, и число гамет с полностью деконденсированными ядрами достигало 100% против 44,5% в контроле. В то же время использование модельной системы деконденсации гаметического хроматина *in vitro* показало, что инкубация эпидидимальных сперматозоидов мышей в золе наночастиц золота приводила к нарушениям динамики процесса декомпактизации хроматина и структуры ядер. Резюмируя скажем, что фактических данных, касающихся влияния наночастиц золота на половые клетки, очень мало, они неоднозначны и не позволяют полностью оценить репродуктивные риски, возникающие при использовании этих, весьма перспективных с практической точки зрения наноструктур. Однако уже имеющиеся результаты позволяют говорить о возможном сильном влиянии наночастиц золота на мужские половые клетки.

ВЫВОДЫ

1. У мышей после интратестикулярного введения химического мутагена дипина (опыт) или физиологического раствора (контроль) динамика количественных, морфогистологических, цитогенетических изменений клеток сперматогенного эпителия, а также изменений в организации гаметического ДНП-комплекса, в целом имела сходную тенденцию. Однако в отличие от контроля в мутагенизированных семенниках эти нарушения носили более выраженный характер.

2. В процессе культивирования КС разделяются на два типа клеток, различающихся по структурной организации ядер и пролиферативной стратегии. Часть КС проявляют себя как полиплоидизирующаяся клеточная популяция.

3. Активация КС к делениям является условием необходимым для развития сперматогенного процесса при трансплантации под капсулу почки.

4. Многократные введения мышам наночастиц золота не нарушали структуру сперматогенного эпителия и не оказывали четкого, сильно выраженного мутагенного влияния на наследственные структуры сперматогониальных стволовых клеток; сравнительно высокую чувствительность к цитогенетическому эффекту наночастиц Au проявили ранние сперматоциты I порядка.

5. В опыте с однократным воздействием наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки процесс индуцированной декомпактизации хроматина в ядрах эпидидимальных спермиев шел в ускоренном темпе, и число гамет с полностью деконденсированными ядрами достигало 100%, в то время как в опыте с многократным воздействием этих частиц выход таких клеток составил 32%.

6. Наночастицы золота нарушают процесс деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах мышей в условиях *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Малолина Е.А., Кулибин А.Ю., Зеленина И.А., **Павлюченкова С.М.**, Рудой В.М., Дементьева О.В., Скуридин С.Г., Евдокимов Ю.М. Наночастицы золота нарушают процесс деконденсации ядерного хроматина в спермиях мышей в условиях *in vitro* // Биол. мембраны. – 2010. – Т. 27. – № 4. – С. 349–353.
2. Захидов С.Т., **Павлюченкова С.М.**, Маршак Т.Л., Рудой В.М., Дементьева О.В., Зеленина И.А., Скуридин С.Г., Макаров А.А., и др. Влияние наночастиц золота на сперматогенез мышей // Изв. РАН. Сер. Биол. – 2012. – № 3. – С. 279–287.
3. **Павлюченкова С.М.**, Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Макаров А.А. Особенности развития мужских половых клеток у мышей после интратестикулярной инъекции дипина // Изв. РАН. Сер. Биол. – 2012. – № 6. – С. 589–600.

Статья в сборнике:

Павлюченкова С.М., Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Рудой В.М., Дементьева О.В., Скуридин С.Г., Зеленина И.А., Хохлов А.Н., Евдокимов Ю.М. Эффекты воздействия наночастиц золота на сперматозоиды мышей // В сб. трудов II Межд. интернет-конф. Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии. – Казань. – 2012. – Т. 2. – С. 223–226.

Тезисы конференций:

1. Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Малолина Е.А., Кулибин А.Ю., Зеленина И.А., **Павлюченкова С.М.**, Рудой В.М., Дементьева О.В., Скуридин С.Г., Евдокимов Ю.М. Влияние наночастиц золота на структуру хроматина спермиев мыши // Тезисы VII Межд. конф. «Молекулярная медицина и биобезопасность». – М. – 2010. – С. 83–84.
2. **Павлюченкова С.М.**, Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Рудой В.М., Дементьева О.В., Скуридин С.Г., Зеленина И.А., Хохлов А.Н., Евдокимов Ю.М. Действие наночастиц золота на структурно-функциональную целостность гаметического ДНП-комплекса у самцов мышей // Сб. тезисов 2-ой Межд. школы «Наномат. и нанотехн. в жив. системах. Безопасн. и Наномед.». – 2011. – С. 33–34.
3. **Павлюченкова С.М.** Использование метода деконденсации гаметического хроматина в экспериментальной нанотоксикологии. XVIII Межд. конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" // Сб. тезисов конференции. – М. – 2011. – С. 15-16.
4. **Pavluchenkova S.M.**, Zakhidov S.T., Marshak T.L., Rudoy V.M., Dement'eva O.V., Skuridin S.G., Zelenina I.A., Khokhlov A.N., Evdokimov Y.M. Influence of gold nanoparticles on mouse sperm // Abstracts of the 2nd International School «Nanomaterials and nanotechnologies in living systems. Safety and Nanomedicine». – Russia. – 2011. – С. 135–136.
5. **Павлюченкова С.М.**, Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Рудой В.М., Дементьева О.В., Скуридин С.Г., Макаров А.А., Евдокимов Ю.М. Наночастицы золота: оценка генотоксической активности в семенниках мышей // Тезисы IV конф. Нанотехн. общества России. – М. – 2012. – С. 70–71.
6. **Павлюченкова С.М.** Эктопическая трансплантация как модель для изучения морфогенетического потенциала клеток Сертоли. XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" // Сб. тезисов конференции. – М. – 2012. – С. 15-16.
7. **Павлюченкова С.М.**, Маршак Т.Л., Захидов С.Т. Изучение семенных канальцев мышей в условиях эктопической трансплантации // В сб.: Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция. – ВВМ С.-Петербург. – 2013. – С. 163–164.
8. Захидов С.Т., **Павлюченкова С.М.**, Маршак Т.Л. Интратестикулярные инъекции как фактор нарушения упаковки ДНП-комплекса в сперматозоидах мышей // В сб.: Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция. – Изд-во ВВМ Санкт-Петербург. – 2013. – С. 124–126.
9. **Павлюченкова С.М.**, Маршак Т.Л., Захидов С.Т. Пролиферация и размножение постмитотических, функционально зрелых клеток Сертоли // IV Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань, Россия. – 2014. – С. 151–151.
10. **Павлюченкова С.М.** Клетки Сертоли половозрелых мышей разных линий *in vitro*. Влияние условий культивирования. XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" // Сборник тезисов конференции. – М. – 2014. – С. 10-11.